

ẢNH HƯỞNG CỦA COLCHICINE VÀ ORYZALIN LÊN CẢM ỨNG ĐA BỘI VÀ PHÁT SINH HÌNH THÁI CỦA CÂY LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus setaceus* Blume) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Thị Thúy Tâm¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Vũ Thị Hiền¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Bùi Văn Thế Vinh², Dương Tấn Nhật^{1,✉}

¹Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (HUTECH)

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 07.8.2019

Ngày nhận đăng: 26.10.2019

TÓM TẮT

Lan Kim Tuyền (*Anoectochilus* spp.) là một trong những cây dược liệu quan trọng được dùng để chữa bệnh như huyết áp, tiểu đường, tim mạch, gan, phổi cũng như phục hồi sức khỏe. Cảm ứng đa bội bằng colchicine và oryzalin được ứng dụng rộng rãi trên nhiều loài thực vật và được xem là công cụ hữu hiệu trong chọn tạo giống cây trồng. Trong nghiên cứu này, chồi non lan Kim Tuyền *in vitro* với chiều cao 1 cm được xử lý với colchicine (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μ M) và oryzalin (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ M) với thời gian xử lý khác nhau (0, 12, 24, 36, 48 giờ). Kết quả cho thấy, chồi được xử lý từ 24 – 48 giờ với nồng độ từ 2 – 10 μ M colchicine và từ 40 – 100 μ M oryzalin đã xuất hiện những biến dị về mặt hình thái từ 10,00% – 16,00% và các chồi này có xu hướng phục hồi sau nhiều lần cấy chuyển. Kích thước khí khổng có liên quan chặt chẽ với mức độ đa bội, cây lưỡng bội ($2n = 2x$) có kích thước khí khổng trung bình khoảng 33,50 μ m ở độ phóng đại x100 và khi đo bằng phương pháp flow cytometry cho kết quả với đỉnh peak ở 70 FL. Những cây đa bội được xác định có kích thước khí khổng lớn hơn 40,12 μ m. Phương pháp đo flow cytometry cho thấy các cây có chiều dài kích thước khí khổng từ 40,12 μ m đến 50,00 μ m đều ở dạng thể khảm giữa cây lưỡng bội ($2n = 2x$) và cây tứ bội ($2n = 4x$) với 2 đỉnh peak 70 FL và 90 FL. Các mẫu được xử lý ở nồng độ 4, 6, 8 μ M colchicine với thời gian xử lý 48 giờ và 60 μ M oryzalin với thời gian xử lý 24 giờ có chiều dài kích thước khí khổng khoảng 52,03 μ m đến 71,25 μ m được xác định là cây tứ bội ($2n = 4x$) với đỉnh peak nằm khoảng 120 FL.

Từ khóa: cảm ứng đa bội, cây tứ bội, khí khổng, lan Kim Tuyền, phát sinh hình thái

MỞ ĐẦU

Chi lan Kim Tuyền (*Anoectochilus*) có khoảng 40 loài, chúng mọc sát khe suối trên những thảm mục của những khu rừng cây lá rộng thường xanh (Belitsky, Bersenev, 1999). Một số loài đã được sử dụng làm thuốc chữa bệnh trong y học cổ truyền của một số nước ở Châu Á như huyết áp, tiểu đường, tim mạch, gan, phổi và phục hồi sức khỏe (Liang *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2000). Một số nghiên cứu về

phân tích hoạt chất đã cho thấy chúng chứa nhiều hợp chất quan trọng trong điều trị bệnh như kinsenoside, flavonoids, β -sitosterol, adenosine và nhiều phức hợp mới đã được tìm thấy (He *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Vũ Quốc Luận *et al.*, 2015, 2017). Năm 1981, cây lan Kim Tuyền được thu hái ngoài tự nhiên có giá khoảng 320 USD/kg trọng lượng tươi và 3200 USD/kg trọng lượng khô và nhu cầu sử dụng loại thảo dược này ngày càng tăng (Lin, Namba, 1981a; 1981b). Cho đến nay,

chúng bị khai thác quá mức và có nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên; các sản phẩm được thương mại hóa trên thị trường hiện nay chủ yếu có nguồn gốc từ nuôi trồng nhân tạo và nhu cầu thị trường của chúng tăng lên hàng năm. Nhu cầu trung bình hàng năm của Hàn Quốc và Nhật Bản khoảng 1000 tấn và 70% phụ thuộc vào hàng nhập khẩu. Theo số liệu thống kê sơ bộ năm 2014, số lượng giống lan Kim Tuyến *Anoectochilus roxburghii* được nuôi cấy là 60 triệu chai, sản lượng hàng năm là 2500 tấn tươi và giá trị hàng năm đạt 30 tỷ nhân dân tệ tại Trung Quốc (Ye *et al.*, 2017). Cầm ứng đa bội bằng colchicine và oryzalin đã được ứng dụng rộng rãi trên nhiều loại cây trồng và được coi là một công cụ hữu hiệu nhằm cải thiện di truyền của nhiều loài thực vật (Madon *et al.*, 2005). Trên một số loài lan Kim Tuyến, cầm ứng đa bội bằng colchicine cũng đã được thực hiện, kết quả cho thấy số lượng nhiễm sắc thể tăng lên gấp đôi trên loài *Anoectochilus roxburghii* tương ứng trong cây lưỡng bội và tứ bội ($2n = 40$ và 80) ở nồng độ 300 mg/L colchicine sau 13 ngày xử lý (Wang *et al.*, 2010). Trên loài lan Kim Tuyến *Anoectochilus formosanus* khi được xử lý với colchicine để cầm ứng đa bội, ở nồng độ 100 mg/L colchicine kết quả đã thu được 50% cây đa bội và định lượng hoạt chất Gastrodin và Flavonoid trong cây tứ bội cao hơn đáng kể so với cây lưỡng bội (Chung *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu này, colchicine và oryzalin được dùng để khảo sát nồng độ và thời gian xử lý thích hợp đối với sinh trưởng và cầm ứng đa bội ở cây lan Kim Tuyến nuôi cấy *in vitro*, đồng thời độ đa bội của cây được xác định bằng phương pháp đo kích thước khí khẩu và phương pháp flow cytometry.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chồi non lan Kim Tuyến *in vitro* được tái sinh từ các đốt thân sau 20 ngày nuôi cấy với chiều cao 1 cm (Hình 1a) được sử dụng để xử lý với colchicine và oryzalin.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy *in vitro* là môi trường

SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) bổ sung 1,0 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 9 g/L agar, 30 g/L đường, 1 g/L than hoạt tính và pH = 5,8 (Vũ Quốc Luận *et al.*, 2015), sau đó được hấp khử trùng trong Autoclave ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút. Sau khi xử lý với colchicine và oryzalin mẫu được cấy vào bình có dung tích 100 mL chứa 20 mL môi trường và đặt trong phòng nuôi với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 55 – 60%, sử dụng ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ 40 – 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý colchicine hoặc oryzalin lên sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyến trong nuôi cấy *in vitro*

Ở trường hợp xử lý bằng colchicine, chồi non lan Kim Tuyến có chiều cao 1 cm được tiến hành ngâm trong dung dịch colchicine ở các nồng độ khác nhau (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μM) với thời gian xử lý (0, 12, 24, 36, 48 giờ). Cuối cùng, chúng được rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần và cấy lên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L đường, 9 g/L agar, 1,0 g/L than hoạt tính. Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống sót, tỷ lệ phát sinh hình thái, chiều cao chồi (cm), số đốt/chồi, khối lượng tươi (g).

Ở trường hợp xử lý bằng oryzalin, chồi non lan Kim Tuyến có chiều cao 1 cm được tiến hành ngâm trong dung dịch oryzalin ở các nồng độ khác nhau (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM) và thời gian xử lý (0, 12, 24, 36, 48 giờ). Cuối cùng, chúng được rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần và cấy lên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L đường, 9 g/L agar, 1,0 g/L than hoạt tính. Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống sót, tỷ lệ phát sinh hình thái, chiều cao chồi (cm), số đốt/chồi, khối lượng tươi (g).

Xác định độ đa bội thông qua khí khẩu

Tách một lớp mỏng ở mặt sau của lá từ các chồi đã xử lý với colchicine và oryzalin. Đặt lớp mỏng lên lam kính, nhỏ một giọt nước, đặt lam kính lên kính hiển vi quan sát và

chụp ảnh khí khổng ở vật kính x 100. Độ dài khí khổng của lá đã xử lý $\geq 1,25$ x độ dài của khí khổng đối chứng được xác định là thể đa bội (Russell, 2004).

Xác định độ đa bội bằng phương pháp flow cytometry

Cân 50 mg lá và đặt trong đĩa petri, thêm 1 ml dung dịch A (14,3 ml $MgSO_4$ lạnh, 15 mg dithiothreitol, 300 μ L PI stock, 375 μ L Triton X100 stock) vào đĩa, sau đó, cắt nhuyễn mẫu bằng lưỡi dao sắc. Mẫu được lọc qua màng lọc có kích thước 33 μ m. Ly tâm 15.000 vòng/phút từ 15 đến 20 giây và loại bỏ phần dịch phía trên. Tiếp theo, hòa tan cặn trong 200 μ L dung dịch B (3 ml dung dịch A, 7,5 μ L RNase, 3.0CRBC) và ủ 15 phút ở 37°C, sau đó, chạy mẫu trên máy Partec Ploidy AnalyserPA-I (Doležel *et al.*, 1989).

Xử lý số liệu

Thí nghiệm xử lý bằng colchicine và oryzalin mỗi nghiệm thức xử lý 25 mẫu với 3 lần lặp lại, bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CRD) theo phương pháp của Compton và Mize (1999) sử dụng để nghiên cứu thực vật trong phòng thí nghiệm và nhà kính. Trung bình của các chỉ tiêu theo dõi giữa các nghiệm thức được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA), sau đó so sánh với phép thử Duncan ở mức tin cậy $P \leq 0,05$ bằng phần mềm SAS 9.1.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý colchicine lên sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyên nuôi cấy *in vitro*

Nồng độ và thời gian xử lý khác nhau của colchicine có tác động lên quá trình sinh trưởng, khả năng sống sót và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyên *in vitro* (Bảng 1). Sau 90 ngày nuôi cấy, chồi lan Kim Tuyên ở các nồng độ 0, 1, 2, 4, 6 μ M/L với thời gian xử lý từ 12 đến 48 giờ cho tỷ lệ sống sót 100% (Bảng 1); khi nồng độ colchicine tăng lên 8 – 10 μ M/L, có hiện tượng chết mẫu ở các mốc thời gian xử lý từ 24

– 48 giờ (Bảng 1, Hình 1h). Witayaporn và đồng tác giả (2015) cũng chỉ ra rằng, tỷ lệ sống sót của cây cau diệp giảm (65,2; 55,6; 48,1; 45,0 %) khi tăng nồng độ xử lý với colchicine (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 % (w/v). Nguyễn Thị Lý Anh và đồng tác giả (2014) khi tiến hành xử lý chồi hoa cầm chướng với colchicine cho rằng, khi tăng nồng độ và thời gian xử lý với tỷ lệ (0,1% và 72 giờ; tương ứng) tỷ lệ sống sót giảm chỉ còn 46,67%. Trong khi đó, cây con được xử lý với 5 mg/L colchicine trong 96 giờ cho tỷ lệ sống sót chỉ có 16% (Suthana *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu này, chồi đỉnh có xu hướng ngừng phát triển và có xu hướng phát triển chồi bên khi xử lý colchicine trong thời gian dài và nồng độ cao (Hình 1d). Các chỉ tiêu theo dõi như: chiều cao, số đốt, khối lượng tươi có xu hướng giảm so với đối chứng khi nồng độ xử lý tăng (Bảng 1). Kết quả cũng cho thấy, một số chồi khi xử lý với nồng độ 4 và 6 μ M trong 48 giờ cũng cho kiểu hình như lá dày và xanh đậm (Hình 1i. 2) và một số dạng hình thái khác như nửa lá khảm màu trắng (Hình 1b), lá loang lổ với các vùng thiếu sắc tố (Hình 1g). Chồi mang lá màu vàng nhưng với viền khảm xanh thu được ở nồng độ xử lý từ 4 – 8 μ M với thời gian từ 24 – 36 giờ (Hình 1e, f). Chồi mang đốt ngắn, lá thu nhỏ, bò lan (Hình 1c) thu được ở nồng độ xử lý 8 μ M trong 48 giờ và 10 μ M trong 24 – 48 giờ. Mẫu xử lý ở nồng độ (6 – 8 μ M) với thời gian xử lý 24 giờ cho tỷ lệ biến dị hình thái cao nhất (15,00 – 15,33 %) (Bảng 1). Tỷ lệ biến dị hình thái chồi trong nghiên cứu này thấp hơn so với báo cáo của một số tác giả như Nguyễn Thị Lý Anh và đồng tác giả (2014) cho kết quả biến dị hình thái đạt (33,33 %) ở nồng độ 0,01% sau 72 giờ. Wu và đồng tác giả (2007) lại cho kết quả tỷ lệ đột biến tăng khi thời gian xử lý tăng dần (24, 48, 72 giờ; 15,63; 34,38; 50% tương ứng) trên đối tượng *P. grandifloras*. Lê Duy Thành (2001) cho thấy, nồng độ xử lý hiệu quả với colchicine là 0,1 – 1,0%, nồng độ thích hợp cho một số loại cây trồng là 0,2%, nồng độ xử lý cao với thời gian ngắn cho hiệu quả tốt hơn khi xử lý với nồng độ thấp và thời gian dài. Khi nghiên cứu tạo giống đa bội bằng colchicine ở nồng độ (0; 0,3; 0,5; 1,0%) trên phôi soma với thời gian 48, 72 và 96 giờ cũng cho kết quả tương tự (Beyene *et al.*,

2013). Tuy nhiên, khi xử lý colchicine tạo đa bội *in vitro*, một số tác giả lại cho rằng nồng độ colchicine thấp và thời gian xử lý dài cho hiệu quả cao hơn như: xử lý nồng độ colchicine 0,025% trong thời gian 6 ngày cho tỷ lệ tứ bội cao nhất là 10% trên cây dưa hấu (Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Kim Hằng, 2010); tạo cỏ tứ bội *Brachiaria* đạt 3,9% khi nồng độ xử lý 0,1% colchicine sau 48 giờ (Carine và Cacilda, 2009). Như vậy, nồng độ và thời gian xử lý colchicine lên quá trình biến dị phụ thuộc vào kiểu di truyền của từng loại cây. Khi xử lý colchicine trên loài lan Cau diệp ngà *Spathoglottis eburnea*, kết quả thu được một số mẫu mang kiểu hình với lá khảm màu hoặc trắng (Witayaporn *et al.*, 2015). Các nồng độ xử lý colchicine (1,25 – 6,25 μM) dẫn đến gia tăng tỷ lệ mẫu chết (Carvalho *et al.*, 2016). Ngoài ra, Awoleye và đồng tác giả (1994) đã cho thấy, chỉ có 24% cây con sống sót khi nó được xử lý với 10,0 μM colchicine. Những kết quả này cho thấy mức độ nhạy cảm khác nhau với colchicine tùy thuộc vào loài (Carvalho *et al.*, 2016). Premjet và Premjet (2016) báo cáo kết quả xử lý colchicine ở nồng độ thấp (0,5 – 2%) không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống, nhưng ở nồng độ cao (5%) tỷ lệ sống giảm xuống còn 50%. Chất ức chế phân bào tạo ra những biểu hiện nổi bật về mặt hình thái có thể nhìn thấy được như lá, màu sắc lá bị thay đổi, nhưng đó chỉ là những biểu hiện tạm thời và chúng dần hồi phục lại bình thường sau thời gian dài nuôi cấy. Tốc độ tăng trưởng của cây được xử lý đột biến với chiều cao thấp hơn, chiều dài lóng ngắn, biến dạng như lá nhăn so với cây lưỡng bội. Nồng độ colchicine càng cao cho tỷ lệ sống càng thấp và tác động của colchicine chủ yếu tập trung vào kỳ giữa của nguyên phân, tuy nhiên không phải tất cả các tế bào đang trong giai đoạn nguyên phân đều trở thành đa bội. Tốc độ tăng trưởng và khối lượng của cây lưỡng bội và đa bội là khác nhau, do sự kết hợp của các tế bào lưỡng bội và đa bội gây ra hiện tượng khảm với lá nhăn (Yang *et al.*, 2015). Như vậy, ở kết quả phát sinh hình thái của nghiên cứu này cho thấy các dạng hình thái mới xuất hiện từ 10% – 15,33% khi thời gian xử lý từ 24 – 48 giờ ở các nồng độ xử lý từ 2 – 10 $\mu\text{M/L}$ colchicine.

Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý oryzalin lên sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyến nuôi cấy *in vitro*

Ảnh hưởng của oryzalin ở các nồng độ và thời gian xử lý với khác nhau lên quá trình sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyến nuôi cấy *in vitro* sau 90 ngày nuôi cấy được thể hiện qua Bảng 2. Tỷ lệ sống sót của chồi khi xử lý với oryzalin cho thấy ở nồng độ thấp 0 – 40 $\mu\text{M/L}$ hầu như không có sự khác biệt đáng kể (trừ nồng độ 40 $\mu\text{M/L}$ với thời gian xử lý 48 giờ) (Bảng 2). Trong khi đó, ở các nồng độ 60 – 100 $\mu\text{M/L}$ tỷ lệ mẫu chết có xu hướng gia tăng. Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với báo cáo của Carvalho và đồng tác giả (2016) cho thấy nồng độ 3 và 6 μM oryzalin không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh trưởng và phát triển; tuy nhiên, tăng nồng độ và thời gian tiếp xúc với oryzalin làm ảnh hưởng đến sự phát triển và phát sinh hình thái *in vitro*, chiều cao trung bình giảm (62,67%), số lượng lá (44,62%), số lượng rễ (70,75%). Awoleye và đồng tác giả (1994) báo cáo tỷ lệ sống sót thấp, số lượng cây tái sinh và chiều dài giảm khi gia tăng nồng độ oryzalin. Ở nồng độ cao và thời gian xử lý dài làm giảm tỷ lệ sống sót còn 50% khi xử lý cây giống với 13, 15, 22 μM oryzalin (Parson *et al.*, 2001). Tác động của oryzalin đã thành công trong việc gây ra sự thay đổi về số lượng nhiễm sắc thể, trong khi nồng độ thấp của oryzalin không ảnh hưởng rõ ràng đến sự phát triển của chồi, tuy nhiên, nồng độ cao làm chồi nhỏ hơn. Stanys và đồng tác giả (2003) cho rằng, tác động của oryzalin lên tái sinh chồi *in vitro* ít bị ảnh hưởng bất lợi hơn so với colchicine. Chiều cao chồi khi được xử lý với oryzalin cho kết quả khác biệt so với đối chứng ở tất cả các nồng độ và thời gian xử lý. Kết quả ghi nhận được cho thấy, chiều cao chồi, số đốt, khối lượng tươi có xu hướng giảm khi nồng độ và thời gian xử lý tăng dần (Bảng 2). Trong quá trình sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi *in vitro*, kết quả cho tỷ lệ phát sinh hình thái cao nhất (14,00; 16,00%) thu được ở nồng độ (40, 80 μM) với thời gian xử lý 36 giờ (Bảng 2). Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Josephine và đồng tác giả (2015) với biến dị kiểu hình (90 – 100%) ở nồng độ xử lý 30 – 150 μM sau 5 ngày

xử lý chồi đỉnh của cây *Zehneria capillacea*, kết quả này cho thấy, sự mẫn cảm với oryzalin giữa các loài rất khác nhau dẫn đến tỷ lệ % về biến dị kiểu hình giữa các loài rất khác nhau. Ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau cũng thu được một số kiểu hình như thân và lá gần như khảm trắng hoàn toàn (Hình 2d, e), trên bề mặt lá loang lổ các vùng thiếu sắc tố (Hình 2a, b, c) chủ yếu thu được ở nồng độ từ 40 - 60 μM và thời gian xử lý dài từ 36 - 48 giờ. Chồi hình thành với thân ngắn với lá nhỏ (Hình 2f, g), hoặc chồi chính không phát triển và hình thành cụm chồi bên theo hướng bò lan và không hình thành lá (Hình 2h, i) thu được ở nồng độ xử lý cao từ 80 - 100 $\mu\text{M/L}$ và thời gian xử lý dài 36 - 48 giờ. Quan sát các cây con sau khi tiếp xúc oryzalin cho thấy một số bất thường về hình thái như lá cong, nhăn, thiếu sắc tố hoặc loang lổ trên bề mặt lá (Lam *et al.*, 2014) và kiểu hình khác biệt

tương tự đã được báo cáo bởi (Harbard *et al.*, 2012). Khi xử lý đột biến có thể dẫn đến những bất thường về hình thái mà không thay đổi về lượng bộ của cây (Harbard *et al.*, 2012). Ảnh hưởng của nồng độ oryzalin lên chiều cao cây cũng là điều hiển nhiên và mong đợi. Tuy nhiên, nhóm tác giả hy vọng rằng, các cây sau khi xử lý sẽ phục hồi và sinh trưởng giống như ban đầu (Lam *et al.*, 2014). Khi xử lý với oryzalin cũng thu được hình thái lá lớn hơn, rễ phát triển mạnh hơn so với cây đối chứng (Parson và Benchamas, 2001). Các cây con được xử lý xuất hiện bạch tạng, lùn với lá dày. Cây con xử lý với 45 μM oryzalin sau 7,5 giờ thường bị chết vì nồng độ cao (Parson và Benchamas, 2001). Như vậy, ở kết quả phát sinh hình thái của nghiên cứu này cho thấy các dạng hình thái mới xuất hiện từ 10% - 16,00% khi thời gian xử lý từ 24 - 48 giờ ở các nồng độ xử lý từ 40 - 100 $\mu\text{M/L}$ oryzalin.

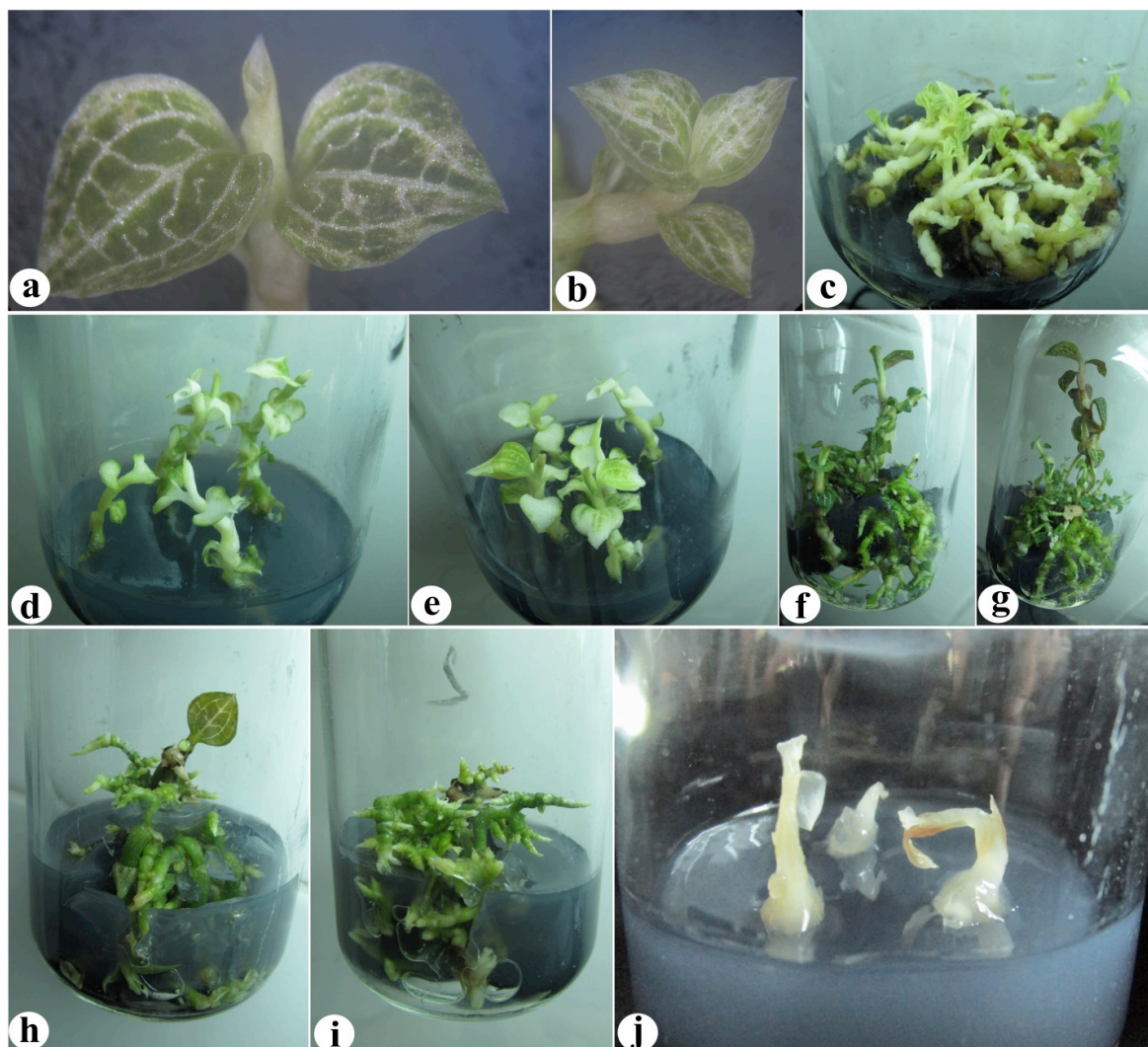


Hình 1. Ảnh hưởng của colchicine ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau lên quá trình sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyến nuôi cây *in vitro*. **a**, Nguồn mẫu *in vitro* trước khi xử lý; **b**, Chồi khảm nửa lá màu trắng; **c**, Chồi mang đốt ngắn, lá thu nhỏ; **d**, Chồi chính ngừng phát triển và phát sinh chồi bên; **e**, **f**, Chồi mang lá màu vàng nhưng với viền khảm màu xanh; **g**, Lá loang lổ với các vùng thiếu sắc tố; **h**, Chồi non chết do nồng độ colchicine cao và thời gian xử lý dài. **i1**, Đối chứng; **i2**, Chồi với lá dày và thân đậm; **i3**, Chồi với lá thuôn dài; **i4**, Chồi mang đốt thân ngắn với lá tròn và nhỏ; **i5**, Chồi mang đốt ngắn với lá nhỏ uốn cong.

Bảng 1. Ảnh hưởng của colchicine ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau lên quá trình sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyến sau 90 ngày nuôi cấy *in vitro*.

Nồng độ colchicine (µM/L)	Thời gian xử lý (giờ)	Số mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu biến dị hình thái (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/chồi	Khối lượng tươi (g)	Hình thái chồi
0	0	100 ^a	0,00 ^l	4,50 ^a	6,00 ^a	0,583 ^a	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	12	100 ^a	4,00 ^k	4,00 ^b	5,53 ^b	0,446 ^b	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	100 ^a	7,00 ^j	3,86 ^{cd}	5,40 ^{bc}	0,430 ^{cd}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
1	36	100 ^a	6,66 ^j	3,76 ^{de}	5,26 ^{cdef}	0,396 ^{hijk}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	100 ^a	8,33 ^{hij}	3,76 ^{de}	4,90 ⁱ	0,386 ^{ijklm}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
2	12	100 ^a	6,66 ^j	3,90 ^{bc}	5,36 ^{bcd}	0,440 ^{bc}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	100 ^a	12,66 ^{cd}	3,86 ^{cd}	5,26 ^{cdef}	0,420 ^{cef}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	36	100 ^a	11,66 ^{cdef}	3,76 ^{de}	5,13 ^{efgh}	0,400 ^{ghij}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
2	48	100 ^a	10,00 ^{ghi}	3,60 ^{fg}	4,96 ^{hi}	0,390 ^{ijkl}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	12	100 ^a	7,66 ^{ij}	3,90 ^{bc}	5,30 ^{cde}	0,426 ^{cde}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	100 ^a	13,00 ^c	3,80 ^{cd}	5,16 ^{efg}	0,403 ^{fghi}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
4	36	100 ^a	10,00 ^{fgh}	3,63 ^{fg}	5,00 ^{ghi}	0,380 ^{klm}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	100 ^a	11,00 ^{def}	3,46 ^{hi}	4,86 ^{ij}	0,376 ^{lmn}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	12	100 ^a	8,33 ^{hij}	3,86 ^{cd}	5,20 ^{def}	0,423 ^{cde}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
4	24	100 ^a	15,33 ^a	3,76 ^{de}	4,96 ^{hi}	0,410 ^{efgh}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	36	100 ^a	13,33 ^{bc}	3,60 ^{fg}	4,90 ⁱ	0,390 ^{ijkl}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	100 ^a	13,00 ^c	3,40 ⁱ	4,70 ^{jk}	0,373 ^{lmn}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
6	12	100 ^a	9,00 ^{ghi}	3,80 ^{cd}	5,26 ^{cdef}	0,416 ^{defg}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	100 ^a	15,00 ^{ab}	3,66 ^{ef}	4,96 ^{hi}	0,390 ^{ijkl}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	36	98 ^b	15,00 ^{ab}	3,46 ^{hi}	4,90 ⁱ	0,383 ^{klm}	Chồi chính chậm phát triển, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
6	48	95 ^c	13,00 ^c	3,43 ^{hi}	4,60 ^{kl}	0,370 ^{mn}	Chồi chính chậm phát triển, hình thành cụm đa chồi, bò lan, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	12	100 ^a	10,66 ^{fge}	3,76 ^{de}	5,10 ^{fgh}	0,400 ^{ghij}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	94 ^d	15,00 ^{ab}	3,53 ^{gh}	5,00 ^{ghi}	0,376 ^{lmn}	Chồi chính chậm phát triển, hình thành cụm đa chồi, bò lan, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
10	36	90 ^e	12,33 ^{cde}	3,40 ⁱ	4,70 ^{jk}	0,373 ^{lmn}	Chồi chính chậm phát triển, hình thành cụm đa chồi, bò lan, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	81 ^f	11,00 ^{def}	3,36 ⁱ	4,50 ^l	0,360 ⁿ	Chồi chính chậm phát triển, hình thành cụm đa chồi, bò lan, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
CV		0,51	10,70	2,15	2,03	2,32	
F-Test		*	*	*	*	*	

Ghi chú: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với P < 0,05 trong Duncan's test.



Hình 2. Ảnh hưởng của oryzalin ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau lên quá trình sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyến nuôi cấy *in vitro*. **a, b**, Chồi mang lá khảm một phần màu trắng; **c-e**, Thân và lá gần như bạch tạng hoàn toàn; **f, g**, Chồi mang đốt ngắn, lá thu nhỏ; **h, i**, Chồi chính ngừng phát triển do nồng độ oryzalin cao và hình thành chồi bên với lá thu gọn; **j**, Chồi non chết do nồng độ oryzalin cao và thời gian xử lý dài.

Bảng 2. Ảnh hưởng của oryzalin ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau lên quá trình sinh trưởng và phát sinh hình thái chồi lan Kim Tuyến sau 90 ngày nuôi cấy *in vitro*.

Nồng độ oryzalin ($\mu\text{M/L}$)	Thời gian xử lý (giờ)	Số mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu biến dị hình thái (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/chồi	Khối lượng tươi (g)	Hình thái chồi
0	0	100 ^a	0,00 ^l	4,60 ^a	5,90 ^a	0,590 ^a	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
10	12	100 ^a	3,66 ^k	4,16 ^b	5,53 ^b	0,456 ^b	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	100 ^a	4,66 ^{jk}	4,00 ^{bc}	5,50 ^b	0,436 ^{bcd}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm

	36	100 ^a	6,00 ^{ijk}	3,90 ^{cd}	5,30 ^{cde}	0,406 ^{bcdef} _g	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	100 ^a	6,33 ^{hij}	3,83 ^{cd} _e	5,00 ^{fgh}	0,400 ^{cdefg}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
20	12	100 ^a	4,66 ^{jk}	3,96 ^{cd}	5,40 ^{bc}	0,443 ^{bc}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	100 ^a	6,00 ^{ijk}	3,83 ^{cd} _e	5,26 ^{cde}	0,400 ^{cdefg}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	36	100 ^a	6,66 ^{ghij}	3,63 ^{fgh} _i	5,10 ^{efg}	0,393 ^{cdefg}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	100 ^a	7,66 ^{fghi}	3,46 ^{ijk}	4,90 ^{gh}	0,383 ^{efghi}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
40	12	100 ^a	5,66 ^{ijk}	4,00 ^{bc}	5,56 ^{bcd}	0,420 ^{bcde}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	100 ^a	13,00 ^{bc}	3,70 ^{efg}	5,20 ^{de}	0,386 ^{defgh}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	36	99,0 ^a	14,00 ^{ab}	3,50 ^{hij}	4,90 ^{gh}	0,373 ^{efghi}	Chồi đơn, mập, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	96,0 ^b	1,00 ^{ef}	3,36 ^{jk}	4,80 ^{hi}	0,366 ^{fghi}	Chồi chính chậm phát triển, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
60	12	100 ^a	10,00 ^{de} _f	3,80 ^{def}	5,13 ^{ef}	0,416 ^{bcdef}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	96,0 ^b	13,66 ^{ab} _c	3,60 ^{ghi}	4,86 ^h	0,400 ^{cdefg}	Chồi chính chậm phát triển, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	36	89,5 ^d	13,00 ^{bc}	3,40 ^{jk}	4,85 ^h	0,380 ^{efghi}	Chồi chính chậm phát triển, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	82,6 ^e	13,33 ^{bc}	3,30 ^{kl}	4,60 ^{ij}	0,360 ^{ghi}	Chồi chính chậm phát triển, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
80	12	97,6 ^a _b	8,66 ^{fgh}	3,70 ^{efg}	5,10 ^{efg}	0,406 ^{bcdef} _g	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	92,6 ^c	16,00 ^a	3,66 ^{efg} _h	4,90 ^{gh}	0,383 ^{efghi}	Chồi chính chậm phát triển, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	36	82,3 ^e	14,33 ^{ab}	3,46 ^{ijk}	4,80 ^{hi}	3,370 ^{efghi}	Chồi chính chậm phát triển, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	72,6 ^g	12,66 ^{bc}	3,16 ^{lm}	4,50 ^{ik}	0,356 ^{ghi}	Chồi chính chậm phát triển, hình thành cụm đa chồi, bò lan, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
100	12	87,6 ^d	9,33 ^{ef}	3,66 ^{efg} _h	4,80 ^{hi}	0,390 ^{defgh}	Chồi đơn, mập, lá to, xanh đậm
	24	77,6 ^f	11,33 ^{cd} _e	3,30 ^{kl}	4,63 ^{ij}	0,370 ^{efghi}	Chồi chính chậm phát triển, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	36	67,3 ^h	12,33 ^{bc} _d	3,03 ^m	4,60 ^{ij}	0,363 ^{ghi}	Chồi chính chậm phát triển, hình thành cụm đa chồi, bò lan, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
	48	62,3 ⁱ	12,00 ^{bc} _d	3,00 ^m	4,40 ^k	0,340 ^{hi}	Chồi chính chậm phát triển, hình thành cụm đa chồi, bò lan, đốt ngắn, lá nhỏ, xanh nhạt
CV		1,67	14,33	2,54	2,06	6,72	
F-Test		*	*	*	*	*	

Ghi chú: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với P ≤ 0,05 trong Duncan's test.

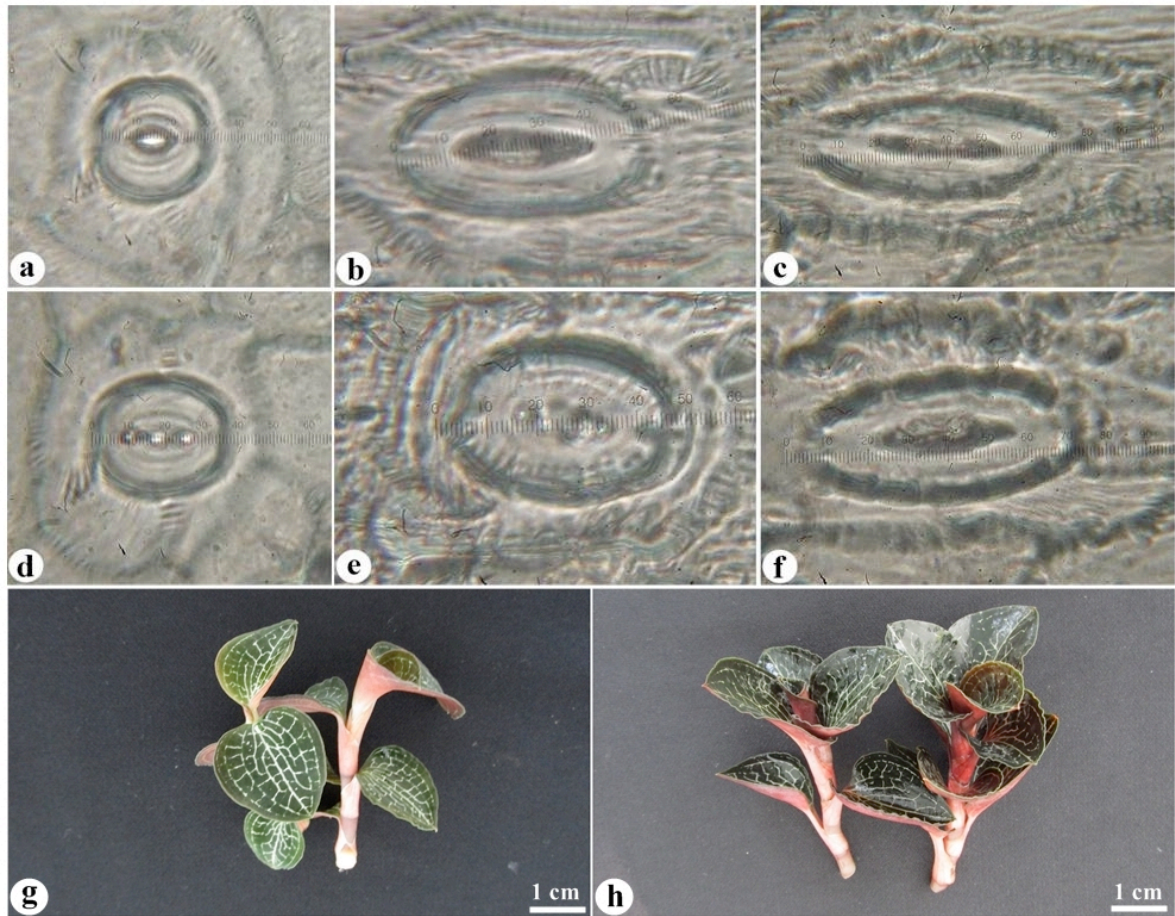
Bảng 3. Xác định độ bội thông qua đo kích thước khí khẩu và phương pháp Flow cytometry.

Nồng độ ($\mu\text{M/L}$)		Thời gian xử lý (giờ)	Kích thước khí khẩu trung bình/lá (μm)	Số mẫu đa bội	Mức độ đa bội	Chỉ số hàm lượng DNA (đo bằng Flow cytometry)
Colchicine	Oryzalin					
0 (ĐC)		0	33,50	0	$2n = 2x$	$\leq 70 \text{ FL}$
4		36	70,15	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
		48	48,45	1	$2n = 4x$	$\leq 120 \text{ FL}$
6		24	45,30	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
		36	43,55	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \ \& \ \leq 90$
		36	47,70	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
		48	55,32	1	$2n = 4x$	$\leq 120 \text{ FL}$
8		24	50,00	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
		24	47,14	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
		36	41,25	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
10		48	52,03	1	$2n = 4x$	$\leq 120 \text{ FL}$
		24	47,38	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
		36	45,32	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
40		48	40,12	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
		24	71,25	1	$2n = 4x$	≤ 120
60		36	47,56	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
80		24	44,15	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$
100		24	46,37	1	$2n = 2x + 2n = 4x$	$\leq 70 \text{ FL} \ \& \ \leq 90 \text{ FL}$

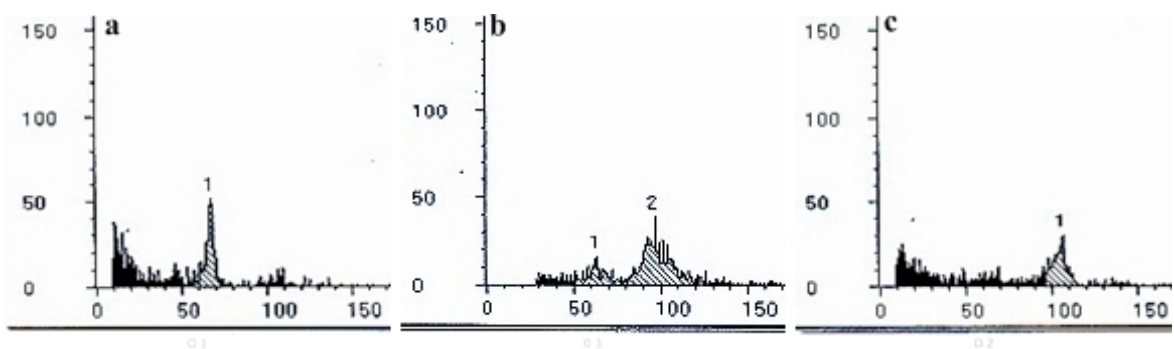
Xác định độ đa bội bằng phương pháp đo kích thước khí khẩu và phương pháp Flow cytometry

Kết quả thu nhận sau 12 tháng cấy chuyên cho thấy, phần lớn các chồi bị biến dị hình thái do xử lý với colchicine và oryzalin có xu hướng phục hồi lại và có kiểu hình giống với những mẫu đối chứng. Tuy nhiên, đã xuất hiện những dạng hình thái mới như thân mập, lá to và đậm hơn (Hình 3h). Qua kiểm tra đo kích thước khí khẩu theo phương pháp của Russell (2004) đã

thu được các mẫu có độ dài khí khẩu của lá đã xử lý $\geq 1,25$ x lần so với độ dài của khí khẩu của lá đối chứng được thể hiện qua bảng 3. Khi quan sát khí khẩu trên những cây được xử lý với colchicine cho thấy kích thước của khí khẩu thường lớn hơn 40,12 μm và có hình dạng bất thường so với những cây không xử lý có kích thước khí khẩu trung bình khoảng 33,50 μm (Hình 3a, d) (Bảng 3) và đỉnh của peak đo bằng phương pháp flow cytometry nằm ở khoảng 70 FL (Hình 4a) là cây lưỡng bội ($2n = 2x$).



Hình 3. Sự khác biệt về hình thái khí khổng và chồi lan Kim Tuyền khi xử lý với colchicine và oryzalin. **a-c,** Xử lý với colchicine; **d-f,** Xử lý với oryzalin; **a, d,** Khí khổng nhỏ, tròn trên lá cây đối chứng với kích thước trung bình từ 33,50 μm ; **b, e,** Khí khổng hình bầu dục với kích thước trung bình từ 40,12 – 50,00 μm thu được trên cây đa bội khảm ($2n = 2x$) và ($2n = 4x$); **c, f,** Khí khổng hình thuôn dài với kích thước trung bình trên 50 – 70 μm thu được trên cây tứ bội ($2n = 4x$); **g,** Cây lưỡng bội ($2n = 2x$); **h,** Cây tứ bội ($2n = 4x$).



Hình 4. Xác định cây đa bội bằng phương pháp Flow cytometry. **a,** Cây lưỡng bội ($2n = 2x$); **b,** Cây đa bội khảm ($2n = 2x$) và tứ bội ($2n = 4x$); **c,** Cây tứ bội ($2n = 4x$).

Kết quả đo khí khẩu trên loài lan Kim Tuyền *Anoectochilus formosanus* khi xử lý với colchicine của Chung và đồng tác giả (2017) cho thấy chiều dài của khí khẩu cây tứ bội (30,5 μm) và cây lưỡng bội (26,5 μm), điều này cho thấy kích thước khí khẩu có sự khác biệt giữa các loài lan Kim Tuyền. Chiều dài khí khẩu đo được trên những cây đa bội có kích thước từ 40,12 μm đến 50,00 μm (Hình 3b, e) cho thấy chúng ở dạng thể khảm giữa cây lưỡng bội ($2n = 2x$) và cây tứ bội ($2n = 4x$) với 2 đỉnh peak nằm khoảng 70 FL và 90 FL (Hình 4b). Kích thước khí khẩu đo được với chiều dài từ 52,03 μm đến 71,25 μm (Hình 3c, f) cho thấy chúng chỉ xuất hiện 1 đỉnh peak nằm khoảng 120 FL (Hình 4c) là cây tứ bội ($2n = 4x$). Kết quả của cây lan Kim Tuyền tứ bội trong nghiên cứu này cũng phù hợp với cây tứ bội của loài lan Kim Tuyền *Anoectochilus formosanus* với đỉnh peak lớn hơn 100 FL (Chung *et al.*, 2017). Kích thước khí khẩu đo được trên những cây đa bội của nghiên cứu này cũng phù hợp với báo cáo của một số tác giả cho thấy cây đa bội, tứ bội có kích thước lỗ khí khẩu thường lớn hơn cây lưỡng bội. Premjet và Premjet (2016) cho thấy chiều dài và chiều rộng của lỗ khí khẩu (35,2 và 27,9 μm) có kích thước lớn hơn khi xử lý với 1% colchicine so với cây lưỡng bội (25,9 và 20,4 μm) và cây không được xử lý có mật độ khí khẩu cao nhất (450/mm) trong khi cây được xử lý có mật độ (110/mm). Trong nghiên cứu của Liu và đồng tác giả (2007) cũng cho thấy, khí khẩu của các cây tứ bội lớn hơn cây lưỡng bội, trong khi đó, Meenakshi và đồng tác giả (2014) cũng cho thấy kích thước lỗ khí khẩu và chiều dài là lớn hơn trong khi mật độ khí khẩu ít hơn. Trong lúc đó, khi quan sát khí khẩu trên các chồi được xử lý với oryzalin cho thấy, kính thước của khí khẩu thường lớn hơn và có hình dạng bất thường so với những chồi đối chứng (Hình 3e, f) và kích thước khí khẩu từ 40,12 μm đến 47,56 μm cũng cho thấy hình thành đa bội dạng khảm giữa cây lưỡng bội ($2n = 2x$) và cây tứ bội ($2n = 4x$) với 2 đỉnh peak thu được tương tự với hình 4b. Trong khi đó, cây có kích thước khí khẩu 71,25 μm được xác định là cây tứ bội ($2n = 4x$) chỉ xuất hiện 1 đỉnh peak nằm khoảng 120 FL (Hình 4c). Parson và Benchamas (2001)

đã cho thấy kích thước lỗ khí khẩu khi được xử lý với oryzalin ở thể hệ MV3 dài hơn (28 μm) trong khi cây đối chứng là (19 μm). Như vậy, kết hợp giữa phương pháp đo kích thước khí khẩu và phương pháp flow cytometry đã xác định được đa bội dạng khảm giữa cây lưỡng bội ($2n = 2x$) và cây tứ bội ($2n = 4x$) và đa bội ở dạng tứ bội ($2n = 4x$) trong quá trình xử lý với colchicine và oryzalin.

KẾT LUẬN

Khi tăng nồng độ và thời gian xử lý với colchicine và oryzalin đã ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng cũng như sự biến dị về mặt hình thái chồi lan Kim Tuyền nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, chồi được xử lý từ 24 – 48 giờ với nồng độ từ 2 – 10 μM colchicine và từ 40 – 100 μM oryzalin đã xuất hiện những biến dị về mặt hình thái từ 10,00% – 16,00% và các chồi này có xu hướng phục hồi sau nhiều lần cấy chuyển. Cây lưỡng bội ($2n = 2x$) có kích thước khí khẩu trung bình khoảng 33,50 μm ở độ phóng đại $\times 100$ và khi đo bằng phương pháp flow cytometry cho kết quả với đỉnh peak ở 70 FL. Phương pháp đo flow cytometry cho thấy các cây có chiều dài kích thước khí khẩu từ 40,12 μm đến 50,00 μm đều ở dạng thể khảm giữa cây lưỡng bội ($2n = 2x$) và cây tứ bội ($2n = 4x$) với 2 đỉnh peak 70 FL và 90 FL. Cây có chiều dài kích thước khí khẩu từ 52,03 μm đến 71,25 μm được xác định là cây tứ bội ($2n = 4x$) với đỉnh peak nằm khoảng 120 FL.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.01-2019-48 và Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Awolaye F, Van DM, Dolezel J, Novak FJ (1994) Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. *Euphytica* 76: 195-202.
- Belitsky I, Bersenev VNA (1999) Jewel orchids. *Mag Amer Orchid Soc* 1999: 33-37.
- Beyene D, Thunya T, Shermarl W, Benya M (2013)

- Induced mutation by colchicine treatment of somatic embryos in 'Namwa' Banana (*Musa sp.* ABB). *Inter Trans J Engin Manag Appl Sci Tech* 4(4): 311-320.
- Carine S, Cacilda BDV (2009) Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. Rich.) Stapf allows intraspecific crosses. *Crop Breed Appl Biotech* 9: 328-334.
- Carvalho MDJSD, Gomes VB, Souza ADS, Aud FF, Santos SJA, Oliveira EJ (2016) Inducing autotetraploids in cassava using oryzalin and colchicine and their *in vitro* morphophysiological effects. *Gen Mol Res* 15(2): 1-14.
- Chung HH, Shi SK, Huang B, Chen JT (2017) Enhanced agronomic traits and medicinal constituents of autotetraploids in *Anoectochilus formosanus* Hayata, a top-grade medicinal orchid. *Molecules* 22: 1-13.
- Compton ME, Mize CW (1999) Statistical considerations for *in vitro* research: I - birth of an idea to collecting data. *In Vitro Cell Dev-Plant* 35: 115-121.
- Doležel J, Binarová P, Lucretti S (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plant* 31: 113-120.
- Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11(1): 1-42.
- Harbard JL, Griff in AR, Foster S, Brooker C, Kha LD, Koutoulis A (2012) Production of colchicine-induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. *Forestry* 85: 427-436.
- He CN, Wang CL, Guo SX, Yang JS, Xiao PG (2006) A novel flavonoid glucoside from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. *J Integrat Plant Biol* 48(3): 359-363.
- Josephine UA, Chimezie E, Bosa EO (2015) Effect of oryzalin treatments on polyploidy induction, phenotypic and quantitative traits *Zehneria capillacea* (Shumach.) C. Jeffrey. *Inter J Trop Agr* 33(3): 2067-2073.
- Lam HK, Harbard JL, Koutoulis A (2014) Tetraploid induction of *Acacia crassicarpa* using colchicine and oryzalin. *J Tro For Sci* 26(3): 347-354.
- Lâm Ngọc Phương, Nguyễn Kim Hằng (2010) Tạo cây dưa hấu tứ bội bằng xử lý colchicine *in vitro*. *Tạp chí Khoa học (Trường Đại học Cần Thơ)* 16a: 234-244.
- Lê Duy Thành (2001) *Cơ sở di truyền chọn giống thực vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tr. 67-97.
- Liang WL, Chen RC, Chiang YJ, Su CH, Yang LL, Yen KL (1990) Study of *Anoectochilus* species. I. Study on the physiological activities of Jin-Sian-Lian. *Formosan Sci* 43: 47-58.
- Lin CC, Huang PC, Lin JM (2000) Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Amer J Clin Med* 28(1): 87-96.
- Lin CC, Namba T (1981a) Pharmacognostical studies on the crude drugs of Orchidaceae from Taiwan (VI) on "kim soan lian" (1). *Shoyakugaku Zasshi* 35: 262-271.
- Lin CC, Namba T (1981b) Pharmacognostical studies on the crude drugs of Orchidaceae from Taiwan (VII) on "kim soan lian" (2). *Shoyakugaku Zasshi* 35: 272-286.
- Liu G, Li Z, Bao M (2007) Colchicine induction chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica* 157: 145-154.
- Liu ZL, Liu Q, Xiao B, Zhou J, Zhang JG, Ya Li (2013) The vascular protective properties of kinsenoside isolated from *Anoectochilus roxburghii* under high glucose condition. *Fitoterapia* 86: 163-170.
- Madon M, Clyde MM, Hashim H, Mohd YY, Mat H, Saratha S (2005) Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. *J Oil Palm Res* 17: 110-123.
- Meenakshi D, Ram AS, Ved PG, Sumer SP (2014) Cytomorphological investigations in colchicine-induced polyploids of *Lablab purpureus* (L.) Sweet. *Ind J Biotech* 13: 347-355.
- Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Thanh Phương, Hồ Thị Thu Thanh, Lê Hải Hà, Nguyễn Thị Hân (2014) Tạo dòng cây chướng (*Dianthus chinensis*) đa bội bằng xử lý colchicine *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(8): 1322-1330.
- Parson S, Benchamas S (2001) Some chemical treatments on Kluai Khai through tissue culture for mutation breeding. *Nat Sci* 35: 231-241.
- Premjet S, Premjet D (2016) Induction of mutation in *Jatropha curcas* L by treatment with mitotic inhibitors. *Aus J Bas Appl Sci* 10(6): 77-85.

- Russell G (2004) Stomatal guard cell measurements using leaf prints. *CSA J* 4: 137-139.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.
- Stanys V, Weckman A, Staniene G (2003) *Polyploidization of Japanese quince plants (Chaenomeles japonica)*, In: Japanese quince - potential fruit crop for northern Europe, Stanys V, Weckman A, Staniene G (Eds), 19-28 pp.
- Suthana K, Thunya T, Anchaya M, Shermarl W (2012) Effect of colchicine on increasing pollen viability in a *Curcuma hybrid (Curcuma sparganifolia × C. parviflora)*. *Nat Sci* 46: 363-370.
- Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Thanh Tùng, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2017) Ảnh hưởng của thể tích và điều kiện thoáng khí trong nuôi cấy *in vitro* và định tính adenosine trong cây lan Kim Tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15(2): 307-317.
- Vũ Quốc Luận, Trần Đình Phương, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2015) Vi nhân giống và định tính hoạt chất β -sitosterol trên cây lan Kim Tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(4): 1113-1125.
- Wang LF, Huang J, Lin X (2010) Polyploidy in *Anoectochilus roxburghii* induced by colchicine *in vitro*. *Acta Agr Zhejiangensis* 22(6): 760-763.
- Witayaporn P, Kanchit T, Ngarmnij C, Nathinee P (2015) Alteration of *Spathoglottis eburnea* Gagnep. Ploidy level after colchicine treatments. *Walailak J Sci Technol* 12: 1-15.
- Wu HZ, Zheng S, He Y, Yan G, Bi Y, Zhu Y (2007) Diploid female gametes induced by colchicine in oriental Lilies. *Sci Hort* 114: 50-53.
- Yang N, Rong E, Li Q, Dong J, Du T, Zhao X, Wu Y (2015) Tetraploid induction and identification of *Gossypium arboreum*. *Agr Sci* 6: 436-444.
- Ye S, Shao Q, Zhang A (2017) *Anoectochilus roxburghii*: A review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications. *J Ethnopharmacol* 209: 184-202.
- Zhang FS, Yali LV, Zhao Y, Guo SX (2013) Promoting role of an endophyte on the growth and contents of kinsenosides and flavonoids of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a rare and threatened medicinal orchidaceae plant. *J Zhejiang Univ-Sci B* 14(9):785-792.

EFFECT OF COLCHICINE AND ORYZALIN TREATMENT ON POLYPLOID INDUCTION AND MORPHOGENESIS OF *Anoectochilus setaceus* Blume CULTURED *IN VITRO*

Vu Quoc Luan¹, Do Thi Thuy Tam¹, Nguyen Phuc Huy¹, Hoang Thanh Tung¹, Vu Thi Hien¹, Do Manh Cuong¹, Bui Van The Vinh², Duong Tan Nhut¹

¹Tay Nguyen Institute of Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Ho Chi Minh City University of Technology (HUTECH)

SUMMARY

Jewel orchid (*Anoectochilus setaceus* Blume) is one of the important medicinal plants used for many common diseases treatment such as hypertension, diabetes, and heart, liver and lung diseases, as well as improving the health in general. Polyploid induction using colchicine and oryzalin has been widely performed in various types of crops and could be considered a valuable tool for plant breeding. In the present study, *in vitro* young shoots of *A. setaceus* Blume (1 cm in height) were treated with different concentrations of colchicine (0, 1, 2, 4, 6, 8, and 10 μ M) and oryzalin (0, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 μ M) at different durations (0, 12, 24, 36, and 48 h). The results showed that shoots with length of treatment from 24 to 48 h and the concentrations from 2 to 10 μ M of colchicine and from 40 to 100 μ M of oryzalin appeared morphological differences (10.00% - 16.00%) but the tendency to return to normal of these shoots after several times of sub-culture was

observed. Stomatal length had a close correlation with the level of ploidy. Diploid plantlets ($2n = 2x$) had the average stomatal length of $33.50 \mu\text{m}$ when observed under an optical microscope at 100x magnification and corresponding to the peak at 70 FL in flow cytometric DNA histogram. In all identified polyploid plantlets, the stomatal lengths were greater than $40.12 \mu\text{m}$. Moreover, flow cytometric analysis indicated that plantlets with stomatal lengths ranged from 40.12 to $50.00 \mu\text{m}$ were diploid-tetraploid mosaicism represented by two separate peaks at 70 FL and 90 FL. Finally, samples treated with 4, 6, and $8 \mu\text{M}$ colchicine with treatment time of 48 h, and $60 \mu\text{M}$ oryzalin with treatment time of 24 h that had stomatal lengths ranged from 52.03 to $71.25 \mu\text{m}$ were determined to be tetraploid ($2n = 4x$) represented by a peak at 120 FL position.

Keywords: *Anoectochilus*, *morphogenesis*, *polyploid induction*, *stomata*, *tetraploid*